

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2003/002500



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P044187	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP2003/002500	International filing date (day/month/year) 04 March 2003 (04.03.2003)	Priority date (day/month/year) 04 March 2002 (04.03.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/54, C12N 9/10		
Applicant SEIKAGAKU CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Best Available Copy

Date of submission of the demand 25 September 2003 (25.09.2003)	Date of completion of this report 15 January 2004 (15.01.2004)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/IPEA/416 (Cover sheet) (July 1999)

Best Available Copy

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP2003/002500

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP03/02500

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-15	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: WO, 01-90334, A2 (Incyte Genomics Inc.), 29 November, 2001 (29.11.01)

Document 2: CN, 1311305, A (Bode Gene Dev. Co., Ltd. Shanghai), 5 September, 2001 (05.09.01)

Document 3: "Molecular Cloning and Expression of Mouse and Human cDNAs Encoding Heparan Sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase," (N.W. Shworak, et al.), J. Biol. Chem., 1997, Vol. 272, No. 44, pages 28008-28019

Claims 1-15

The subject matters of claims 1-15 do not appear to be novel in view of document 1.

Document 1 describes (1) a human drug metabolic enzyme 100% homologous to the amino acid numbers 37-346 of SEQ ID NO:2 of the present application and 99% homologous to the base sequence of SEQ ID NO:1 of the present application, (2) a gene encoding the said metabolic enzyme, (3) a recombinant polynucleotide having the said gene, (4) a transformed cell having the said gene introduced in it, and (5) a method for obtaining a peptide from the said cell.

Claims 1-8 and 13

The subject matters of claims 1-8 and 13 do not appear to be novel in view of document 2.

Document 2 describes a human heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 100% homologous to the amino acid numbers 37-346 of SEQ ID NO:2 of the present application and 99% homologous to the base sequence of SEQ ID NO:1 of the present application.

Claims 9-12, 14 and 15

The subject matters of claims 9-12, 14 and 15 do not appear to involve an inventive step in view of document 2.

It is considered to have been a well-known technique in this field as of the priority date of the present application, to integrate a publicly known DNA into a vector, and to integrate the vector into a host cell for transformation, thereby expressing and producing an intended protein. So, a person skilled in the art could have easily produced a vector of the human heparan sulfate 3-O-sulfotransferase described in document 2, and to transform the vector into a host cell.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP03/02500

Supplemental Box

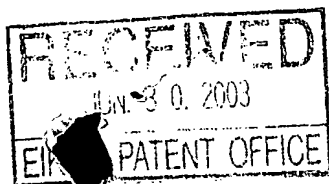
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of : V

Claims 1-15

The subject matters of claims 1-15 do not appear to involve an inventive step in view of document 3.

The base sequences of the DNAs encoding the same enzymes or ligands derived from related animals are generally highly homologous to each other, and it is a well-known technique, to screen a cDNA library prepared from the cells considered to synthesize an intended protein using a DNA including a sequence high in the conservation of (highly homologous to) a base sequence as a probe, for isolating a DNA hybridizing with the said probe. Considering these matters, it would have been easy to conceive of designing a probe from an amino acid sequence or base sequence conserved in the murine or human heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase (3-OST) described in document 3, and of preparing a cDNA library of another organ or another animal, in order to newly isolate a 3-OST gene, for deciding its base sequence or the amino acid sequence corresponding to the base sequence.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OGURI, Shohei
Eikoh Patent Office
28th Floor, ARK Mori Building
12-32, Akasaka 1-chome
Minato-ku, Tokyo 107-6028
Japan

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 18 June 2003 (18.06.03)	
Applicant's or agent's file reference P044187	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP03/02500	International filing date (day/month/year) 04 March 2003 (04.03.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 04 March 2002 (04.03.02)
Applicant SEIKAGAKU CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
04 Marc 2002 (04.03.02)	2002-057527	JP	23 May 2003 (23.05.03)
26 Augu 2002 (26.08.02)	2002-245994	JP	23 May 2003 (23.05.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.90.90

Authorized officer

Florliza DAYAO (Fax 338 9090)

Telephone No. (41-22) 338 8986

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 03 FEB 2004

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 P 0 4 4 1 8 7	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 0 3 / 0 2 5 0 0	国際出願日 (日.月.年) 0 4 . 0 3 . 2 0 0 3	優先日 (日.月.年) 0 4 . 0 3 . 2 0 0 2
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C 1 2 N 1 5 / 5 4 , C 1 2 N 9 / 1 0		
出願人 (氏名又は名称) 生化学工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25. 09. 2003	国際予備審査報告を作成した日 15. 01. 2004	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 美葉子	4 N 9 8 3 9
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | | |
|--------------------------|------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-15	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-15	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-15	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: WO 01/90334 A2(ENCYTE GENOMICS INC)2001.11.29

文献2: CN 1311305 A(BODE GENE DEV CO LTD SHANGHAI)2001.09.05

文献3: Shworak NW, et. al., Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase., J Biol Chem. (1997), Vol. 272, No. 44, p. 28008-28019

【請求の範囲1-15】

請求の範囲1-15に係る発明は文献1より新規性を有さない。

文献1には、本願配列番号2のアミノ酸番号37~346をコードするアミノ酸配列と100%、本願配列番号1の塩基配列と99%の相同性を有するヒトの薬物代謝酵素、該代謝酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を有する組換えポリヌクレオチド、該遺伝子を導入した形質転換細胞、該細胞によりペプチドを得る方法が記載されている。

【請求の範囲1-8、13】

請求の範囲1-8、13に係る発明は、文献2より新規性を有さない。

文献2には、本願配列番号2のアミノ酸番号37~346をコードするアミノ酸配列と100%、本願配列番号1の塩基配列と99%の相同性を有するヒトのheparan sulfate 3-O-sulfotransferaseが記載されている。

【請求の範囲9-12、14、15】

請求の範囲9-12、14、15に係る発明は、文献2より進歩性を有さない。

本願優先日当時、公知のDNAをベクターに組み込むこと、そのベクターを宿主細胞に組み込んで形質転換し、目的タンパク質を発現、製造することは、当該分野における周知技術であると認められるから、文献2に記載されるヒトのheparan sulfate 3-O-sulfotransferaseのベクターを作製すること、該ベクターを宿主細胞に形質転換することは、容易になし得るものであると認める。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V. 欄の続き

【請求の範囲 1-15】

請求の範囲 1-15に係る発明は文献 3 より進歩性を有さない。

近縁の生物に由来する同じ酵素やリガンドをコードする DNA の塩基配列は、一般的に相同性が高く、そして、塩基配列の保存性が高い (相同性が高い) 配列を含む DNA をプローブとし、目的タンパク質を合成していると思われる細胞から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングして、該プローブとハイブリド形成する DNA を単離することは、周知の技術であることを考慮すると、文献 3 に記載されている、マウス、ヒトの heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase (3-OST) に保存されているアミノ酸配列や塩基配列からプローブを設計し、他臓器や他動物の cDNA ライブラリーを調整し、新たな 3-OST 遺伝子を単離し、その塩基配列、塩基配列に相当するアミノ酸配列を決定することは、容易に想到しうるものであると認められる。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02/42437 A2 (PE CORP. NY), 30 May, 2002 (30.05.02), & US 2002/0086381 A1 & US 6420150 B1 & AU 200239256 A	1-15
P, X	Xia G. et al., Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1., J.Biol.Chem. (2002 Oct.), Vol.277, No.40, pages 37912 to 37919	1-15
X	WO 01/90334 A2 (INCYTE GENOMICS INC.), 29 November, 2001 (29.11.01), & AU 200174981 A	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 April, 2003 (02.04.03)Date of mailing of the international search report
15 April, 2003 (15.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02500

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1311305 A (BODE GENE DEV. CO., LTD. SHANGHAI), 05 September, 2001 (05.09.01), (Family: none)	1-15
X	Shworak NW. et al., Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D- glucosaminyl 3-O-sulfotransferase., J.Biol.Chem. (1997), Vol.272, No.44, pages 28008 to 28019	1-15

5061548

10/506548

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 12 日 (12.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/074708 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/54, 9/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02500

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 4 日 (04.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-057527 2002 年 3 月 4 日 (04.03.2002) JP
特願2002-245994 2002 年 8 月 26 日 (26.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP]; 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo (JP). アマシャム バイオサイエンス株式会社 (AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.) [JP/JP]; 〒169-0073 東京都新宿区百人町三丁目25番1号 サンケンビルヂング Tokyo (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 成松 久 (NARI-MATSU, Hisashi) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市梅園一丁目1番1 つくば中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 杉岡 しげみ (SUGIOKA, Shigemi) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つく

ば市梅園一丁目1番1 つくば中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 望月 秀雄 (MOCHIDUKI, Hideo) [JP/JP]; 〒465-0024 愛知県名古屋市名東区本郷二丁目63 ザ・ウイングス305 Aichi (JP).

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外 (OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SULFOTRANSFERASE, ITS POLYPEPTIDE AND DNA ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 硫酸基転移酵素、そのポリペプチド及びそれをコードする DNA

(57) Abstract: Glycosaminoglycan sulfotransferase; its polypeptide; a nucleic acid having a base sequence encoding the same; an enzyme preparation for synthesizing glycosaminoglycan which contains the enzyme or polypeptide as described above; and a process for producing glycosaminoglycan using the enzyme preparation.

(57) 要約: グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素(グリコサミノグリカンスルホトランスフェラーゼ)、そのポリペプチド、それをコードする塩基配列を有する核酸、上記酵素又はポリペプチドを含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤、及びかかる酵素剤を用いたグリコサミノグリカンの製造法。



WO 03/074708 A1

明 細 書

硫酸基転移酵素、そのポリペプチド及びそれをコードするDNA

技術分野

本発明は、グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（グリコサミノグリカンスルホトランスフェラーゼ）、そのポリペプチド、それをコードする塩基配列を有する核酸、上記酵素又はポリペプチドを含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤、及びかかる酵素剤を用いたグリコサミノグリカンの製造法に関するものである。

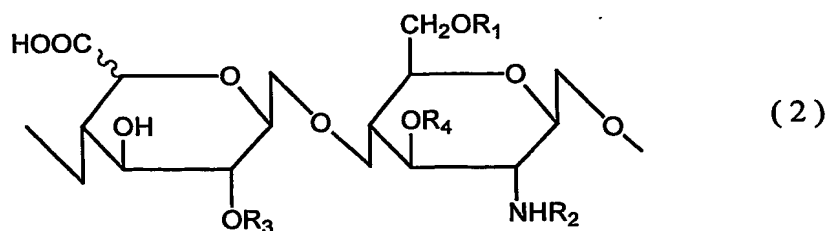
背景技術

本明細書中、糖及び糖残基は特に明記しない限り、光学異性体はイズロン酸を除き全て D 体を示す。また D-グルコサミン（N 置換体を含む意味で使用することもある）を「GlcN」と、N-アセチル-D-グルコサミンを「GlcNAc」と、D-グルクロン酸を「GlcA」と、L-イズロン酸を「IdoA」と、GlcA、IdoA を含む、炭素数 6 のウロン酸を示すヘキサロン酸を「HexA」と略記することもある。

ヘパリン及びヘパラン硫酸は、HexA 残基（GlcA 残基又は IdoA 残基）と GlcNAc 残基の二糖（ $4\text{GlcA } \beta 1 / \text{IdoA } \alpha 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \alpha 1$ ）の繰り返し構造を基本骨格（かかる基本骨格を以下「ヘパリン骨格」とも記載する）とし、その HexA 残基の 2 位ヒドロキシル基及び GlcN 残基の 2 位アミノ基、3 位ヒドロキシル基、及び 6 位ヒドロキシル基のいずれか 1 以上が硫酸化されたグリコサミノグリカンの一種である。

これまで、「ヘパリン」又は「ヘパラン硫酸」の硫酸基は、下記式 2 中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、又は R_4 で示される位置の 1 以上に結合していることが知られて

いる。しかし、 R_1 、 R_2 、 R_3 、及び R_4 の全てが硫酸基 (SO_3^-) であるグリコサミノグリカンとその製造方法は知られていなかった。



一方、ヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンは様々な生理活性を有することが一般に知られている。例えばヘパリンは血液に対し抗凝固活性を示すことが古くから知られており (Thromb. Res., 75, 1-32 (1994))、また各種成長因子と親和性を有して成長因子の安定化又は活性化に働くことが知られている (Glycobiology, 4, 451 (1994))。ヘパラン硫酸も各種成長因子との親和性を有しており成長因子を安定化又は活性化させて創傷治癒の促進に働くこと (J. Phthol., 183, 251-252 (1997)) 等が知られている。またヘパリンの構成糖である GlcN の 6 位に結合した硫酸基のみを特異的に脱硫酸化することで得られる 6-O-脱硫酸化ヘパリンは、血液に対する抗凝固活性は失っているが創傷治癒を促進する働きを有していることが知られており (国際公開 WO 00/06608 号)、また過ヨウ素酸酸化還元処理と HexA の 2 位の特異的な脱硫酸化とを組み合わせ得られる過ヨウ素酸酸化還元 2-O-脱硫酸化ヘパリン (主にヘパリン骨格を維持している) は各種成長因子の安定化及び神経成長の促進に働くことが知られている (特開平 11-310602 号公報)。

これらの事実から、ヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンは様々な生理活性を有すると考えられ、ヘパリンの誘導体は極めて多くの可能性を有していると考えられている。

一方、グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素の遺伝子がクローニングされ、該酵素を大量に得ることにより、硫酸基受容体となるグリコサミノグリカンに対する該酵素の基質特異性についての情報を得ることが可能となり、グリコサミノグリカンの構造と機能の関係を研究する上で有用なアプローチが提供されることが考えられる。グリコサミノグリカンの生合成、その中でもヘパリン／ヘパラン硫酸の生合成には多くの硫酸化のプロセスがあることが知られており（グリコテクノロジー⑤、57（1994）、講談社サイエンティフィク発行）、この硫酸化には様々なグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素が関与しているものと考えられる。ヘパリン／ヘパラン硫酸に硫酸基を転移するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素としては、ヘパラン硫酸 N-脱アセチル／N-硫酸基転移酵素（以下「NDST」と略記することもある）、ヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素（以下「HS2ST」と略記することもある）、ヘパラン硫酸 3-O-硫酸基転移酵素（以下「HS3OST」と略記することもある）及びヘパラン硫酸 6-O-硫酸基転移酵素（以下「HS6ST」と略記することもある）等が種々の生物、特にヒトから単離されており、それらの cDNA のクローニングがされている。

ヒトの HS3OST の cDNA は、J. Biol. Chem., 272, 28008-28019 (1997) において開示されており、当該文献に記載されている cDNA は Genbank に受け入れ番号 AF019386 として登録されている。

ヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンに硫酸基を転移することができる酵素は、ヘパリンやヘパラン硫酸の酵素合成に使用することができる可能性が高く極めて有用であるが、そのような酵素は基質特異性が高く、様々な種類のヘパリンやヘパラン硫酸を工業的に合成するためには様々な種類の酵素を使用して効率的に合成を行う必要がある。しかし、ヘパリン骨格に硫酸基を転移する酵素のバリエーションは、まだ十分であるとはいえない。

したがって、酵素を利用することにより新たな構造を有するグリコサミノグリカンを製造することが可能となれば、かかるグリコサミノグリカンが有する生理活性を探索することが可能となる。

発明の開示

本発明は新規な硫酸基転移酵素を提供するとともに、そのポリペプチドのアミノ酸配列をコードする cDNA をクローニングすることにより、当該酵素を簡便な方法により大量に入手する手段を提供し、それにより酵素化学的に合成することができるグリコサミノグリカンのバリエーションを増すと共に、ヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンの構造—機能の関係の解明に寄与することを目的とする。

すなわち本発明は以下の通りである。

- (1) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号 37～346 を有するポリペプチド、または該アミノ酸配列に 1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加および／または転移を有するアミノ酸配列を有するとともに硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素のポリペプチド。
- (2) ポリペプチドが配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする (1) 記載のポリペプチド。
- (3) ポリペプチドが配列番号 2 記載のアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 37～346 からなることを特徴とする (1) 記載のポリペプチド。
- (4) グリコサミノグリカンがヘパリン又はヘパラン硫酸であることを特徴とする (1)～(3) のいずれか一項記載のポリペプチド。
- (5) (1)～(4) のいずれか一項記載のポリペプチドを含むとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素。

(6) (1) ~ (4) のいずれか一項記載のポリペプチド又は(5)記載の硫酸基転移酵素をコードする核酸。

(7) 配列番号1記載の塩基配列からなることを特徴とする核酸。

(8) (6) 又は(7)記載の核酸又はその塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることを特徴とする核酸。

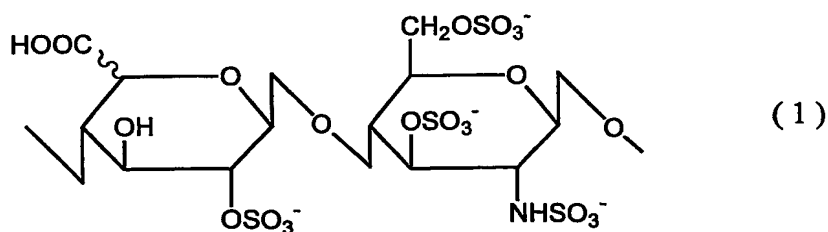
(9) (6) ~ (8) のいずれか一項記載の核酸を含むことを特徴とする発現ベクター。

(10) (9)記載の発現ベクターを含むことを特徴とする組換え体。

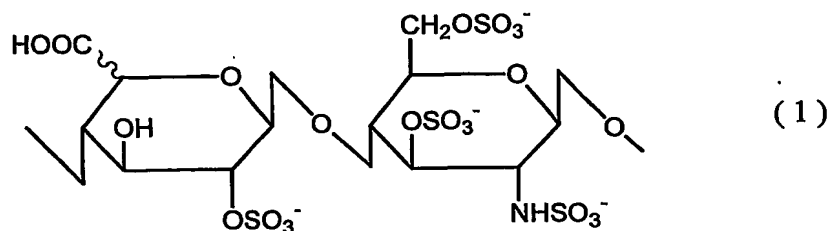
(11) 宿主細胞に(9)記載の発現ベクターを導入してなることを特徴とする組換え体。

(12) (10) 又は(11)記載の組換え体を生育させ、得られた生育物から(1) ~ (4) のいずれか一項記載のポリペプチド又は(5)記載の硫酸基転移酵素を採取することを特徴とするポリペプチド又は硫酸基転移酵素の製造方法。

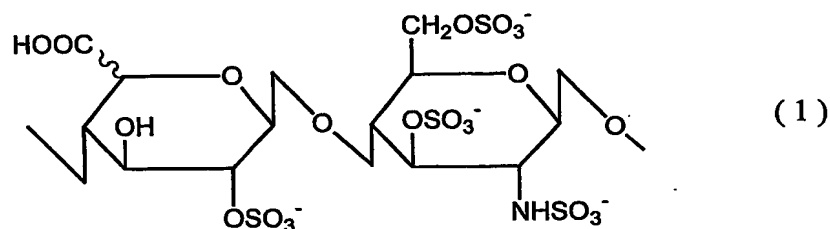
(13) 請求の範囲1 ~ 4 のいずれか一項記載のポリペプチド又は請求の範囲5記載の硫酸基転移酵素を含むことを特徴とする、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤。



(14) ヘパリン又はヘパラン硫酸に、(13)記載の酵素剤を作用させて、硫酸基供与体から硫酸基受容体に硫酸基を転移することを特徴とする下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの製造方法。



(15) (1) ~ (4) のいずれか一項記載のポリペプチド又は (5) 記載の硫酸基転移酵素の、下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成の触媒としての使用。



図面の簡単な説明

第 1 図は、実施例に記載された精製した SFT-1-FLAG をウエスタンブロッティングにより解析した写真である。

第 2 図は、ヘパラン硫酸及びヘパリンに対する硫酸基転移活性を示す図である。丸はヘパラン硫酸に対する硫酸基転移活性を示し、四角はヘパリンに対する硫酸基転移活性を示す。

第 3 図は、コンドロイチン硫酸 D、コンドロイチン、デルマタン硫酸、及びデルマタンへの硫酸基転移活性を示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸 D、黒四角はコンドロイチン、黒丸はデルマタン硫酸を、白四角はデルマタンに対する硫酸基転移活性を示す。

第4図は、ヘパリンに対して、本発明酵素剤により、放射能で標識した硫酸基を転移して得られたグリコサミノグリカン、ヘパリン分解酵素で分解して得た分解物を高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である。縦軸は ^{35}S の放射能 ($\text{dpm} \times 10^{-3}$) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

第5図は、「濃縮試料」をヘパリン二脱硫酸化酵素で消化した産物を再度、高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である (B)。Aはヘパリンに脱硫酸化酵素で処理していない対照を示す。縦軸は ^{35}S の放射能 ($\text{dpm} \times 10^{-3}$) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

第6図は、「濃縮試料」の不飽和ウロン酸のみを特異的に分解した試料を、高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である (A)。Bは放射能で標識した標準品を同様に高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である。縦軸は ^{35}S 又は ^3H の放射能 ($\text{dpm} \times 10^{-3}$) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

第7図は、本発明酵素剤1で「放射能で標識した硫酸基」を転移したヘパラン硫酸を分解して得られる不飽和二糖を、高速液体クロマトグラフィーで分画した際の、各画分における放射能分布を示す図である。縦軸は ^{35}S の放射能 ($\text{dpm} \times 10^{-3}$) を示し、横軸は保持時間 (分) を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、ヘパラン硫酸を硫酸化するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素をコードする塩基配列を有する DNA を鋭意検索し、該酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有する新規な DNA を発見し、該 DNA を発現させることにより該グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素が得られること、及びかかる該グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素を利用することにより新たな構造を有するグリコサミノグリカンが製造されることを確認して本発明を完成させた。

以下に、本発明の実施の形態を説明する。

(1) 本発明酵素／本発明ポリペプチド

本発明酵素は配列番号2記載のアミノ酸配列のうち少なくともアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドを有するとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（SFT-1）である。

本発明酵素におけるポリペプチド（以下、「本発明ポリペプチド」ともいう）は例えば配列番号2記載のアミノ酸番号1～346からなるポリペプチド又は配列番号2記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。このようなポリペプチドはほ乳類由来であることが好ましく、特にヒト由来であることが好ましい。かかるポリペプチドは、特に配列番号2記載のアミノ酸配列のうち予測される膜貫通領域（配列番号2記載のアミノ酸番号1～36からなる領域）を除いたアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列からなるポリペプチドはいわゆる可溶化形態となり調製及び利用が容易となるため好ましい。

一般に、酵素タンパク質のアミノ酸配列のうち、1又は複数（通常は2以上34以下）の構成アミノ酸が置換、欠失、挿入、付加および／または転位しても酵素活性が維持されることが知られ、同一酵素のバリエーションであるということが出来るが、本発明ポリペプチドにおいても配列番号2記載のアミノ酸配列に1又は複数（2以上34以下）の構成アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加および／または転位等の部分的な変異が起こっていても後述の硫酸基を転移する活性を保持している限りにおいて、本発明ポリペプチドと実質的に同一の物質であるということが出来る（このような配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに部分的な変異を有するポリペプチドを便宜的に「修飾ポリペプチド」と記載する）。このような修飾ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号

2に示されるアミノ酸配列と 90%以上、好ましくは 95%以上、さらに 97%以上の相同性を有することを好ましい。アミノ酸配列の相同性は、FASTA のような周知のコンピュータソフトウェアを用いて容易に算出することができ、このようなソフトウェアはインターネットによっても利用に供されている。

なお、上記本発明ポリペプチドは、そのアミノ酸配列が上記した通りのものであり、上記した酵素活性を有するものであれば該ポリペプチドの構成アミノ酸に糖鎖が結合していても良い。すなわち本発明ポリペプチドには糖タンパク質の形態も当然に包含する。

本発明酵素の反応における硫酸基供与体としては、硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移することが可能な物質であれば特に限定はされないが、一般的に生体内で硫酸基供与体として働いていることが知られている 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸（活性硫酸：以下「PAPS」とも略記する）が本発明酵素の生体内における硫酸基供与体である可能性が高いため好ましい。

本発明酵素の硫酸基受容体としてのグリコサミノグリカンは、たとえばヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンなどが例示されるが、特にヘパラン硫酸及びヘパリンなどのいわゆるヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンが好ましく、特にヘパラン硫酸が好ましい。なお、本発明酵素は後述の実施例からも明かであるが、サメ軟骨由来のコンドロイチン硫酸、牛気管由来のコンドロイチン硫酸を脱硫酸化して得たコンドロイチン、ブタ皮由来のデルマタン硫酸、及びニワトリ鶏冠由来のデルマタン硫酸から硫酸基を除去した脱硫酸化デルマタン硫酸には硫酸基を転移する活性を実質的に有しない。

このような本発明酵素の硫酸基転移活性は例えば、放射能（ ^{35}S 、 ^3H （トリチウム）等）や蛍光物質（基質に立体障害などを起こさないことから放射能が好ましい）等の標識物質で標識した PAPS を用いてグリコサミノグリカンを硫酸

基受容体として使用して緩衝液中で 20～40℃条件下で酵素反応を行い、受容体が標識物質で標識されるか否かを、例えば反応後の反応溶液をゲル濾過又は高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」とも略記する）などの分離手段と、標識物質を検出する手段（標識物質として放射能を用いる場合にはシンチレーションカウンター又はオートラジオグラフィーなどの放射能検出手段、標識物質として蛍光物質を用いる場合には蛍光検出器による検出）とを組み合わせることで、容易に確認することが可能である。

このようにして得られた本発明酵素は、グリコサミノグリカン、特にヘパリン及びヘパラン硫酸に特異的に硫酸基を転移する活性を有しているため、後述の本発明酵素剤として使用することが可能である。

（２）本発明核酸、本発明発現ベクター、及び本発明組換え体

本発明核酸は、本発明酵素又は本発明ポリペプチドをコードする核酸である。

本発明核酸は、本発明酵素又は本発明ポリペプチドをコードする限りにおいて、デオキシリボ核酸（DNA）ともリボ核酸（RNA）とも限定はされず、また 1 本鎖であろうと 2 本鎖であろうと限定はされない。しかし、上記本発明酵素及び本発明ポリペプチドがヒト由来のアミノ酸配列であるため、ヒトをはじめとする多くの生物においてポリペプチドをコードする働きを有している DNA であることが好ましい。

本発明における「コードする核酸」とは、一般的にはタンパク質（ポリペプチド）合成における転写の際に、mRNA 合成の鋳型となる鋳型鎖の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸、及び鋳型鎖の塩基配列からなる核酸のいずれも指称する。

このような核酸の塩基配列としては例えば配列番号 1 記載の塩基配列若しくは配列番号 1 記載の塩基配列中、塩基番号 109～1041 からなる塩基配列（アミノ酸番号 37～346 のコード領域に対応している塩基配列）、又はこ

これらの塩基配列に相補的な塩基配列を示し、このような塩基配列からなる核酸は本発明核酸に包含される。

さらに、一本鎖の核酸は一定条件下でそれに相補的な塩基配列を有する核酸とハイブリダイズすることが知られているが、本発明核酸においても配列番号 1 記載の塩基配列若しくは配列番号 1 記載の塩基配列中、塩基番号 109～1041 からなる塩基配列、又はこれらの塩基配列に相補的な塩基配列からなるヌクレオチド鎖にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸も包含される。

ここでストリンジェントな条件下とは、50%ホルムアミド、5×SSPE（塩化ナトリウム／リン酸ナトリウム／EDTA（エチレンジアミン四酢酸）緩衝液）、5×デンハルト溶液（Denhardt's solution）、0.5% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、変性サケ精子 DNA100 μ g/ml 存在下、42℃の条件下及びこれと実質的に同一の条件下などが例示される。すなわちストリンジェントな条件とは、通常の遺伝子のハイブリダイゼーションに用いられる条件であり、ノザンプロット、サザンプロット、ハイブリダイゼーションを用いたスクリーニング等を使用される条件であれば、ここにいう「ストリンジェントな条件下」に包含される。

本発明核酸の好ましい具体的態様の一つである、配列番号 1 記載の塩基配列中、塩基番号 109～1041 からなる塩基配列からなる DNA は、後述の実施例に記載された方法によって調製することも可能であり、また本発明によりその塩基配列のすべてが明らかとされたため、例えばヒト由来の cDNA ライブラリーを鋳型として用いて 5' プライマー（配列番号 3）及び 3' プライマー（配列番号 4）を用いて常法によりポリメラーゼチェーン反応（以下「PCR」とも略記する）を行うことで調製することができる。また同様に 5' プライマーとして配列番号 5 記載のプライマーを用い、3' プライマーとして配列番号 4 記載の

プライマーを用いて PCR を行うことで、配列番号 1 記載の塩基配列からなる DNA を調製することも可能である。

本発明発現ベクターは上述の本発明核酸を含むことを特徴としており、通常は DNA である本発明核酸と、本発明酵素が導入される自体公知の基本ベクター（プラスミド、ファージ、ウイルス等）からなり、宿主細胞中で本発明酵素又は本発明ポリペプチドを発現しうるように構築されている。

上記本発明発現ベクターとして利用する基本ベクターは使用する宿主細胞に合わせて当業者であれば適宜選択することができ、選択した基本ベクターに上記本発明核酸を常法により連結して本発明発現ベクターを構築することができる。

また、本発明発現ベクターを発現させて本発明酵素や本発明ポリペプチドを得る際に、その分泌、単離、精製、分析が容易となるように、本発明酵素や本発明ポリペプチドを識別ペプチドとの融合タンパク質として発現しうるよう構築してもよい。この場合において、本発明酵素及び本発明ポリペプチドと識別ペプチドとの配置は、識別ペプチドが本発明酵素及び本発明ポリペプチドの C 末端側に結合していても或いは N 末端側に結合していてもよい。また、このような結合は、何ら生理活性を有しないアミノ酸配列（2～10 個程度のアミノ酸からなるペプチド）からなるスペーサーを介してなされていても、本発明酵素及び本発明ポリペプチドが硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する限りにおいて制限はされない。

識別ペプチドは、例えばシグナルペプチド（多くのタンパク質の N 末端に存在し、タンパク質の選別のために細胞内で機能している 15～30 アミノ酸残基からなるペプチド：例えば OmpA、OmpT、Dsb 等）、プロテインキナーゼ A、プロテイン A（黄色ブドウ球菌細胞壁の構成成分で分子量約 42,000 のタンパク質）、グルタチオン S 転移酵素、His タグ（ヒスチジン残基を 6～10 個並べて配した配列）、myc タグ（cMyc タンパク質由来の 13 アミノ酸配列）、FLAG ペ

プチド (8 アミノ酸配列からなる分析用マーカー)、T7 タグ (gene10 タンパク質の最初の 11 アミノ酸配列)、S タグ (膵臓 RNaseA 由来の 15 アミノ酸配列)、HSV タグ、pelB (大腸菌外膜タンパク質 pelB の 22 アミノ酸配列)、HA タグ (ヘマグルチニン由来の 10 アミノ酸配列)、Trx タグ (チオレドキシン配列)、CBP タグ (カルモジュリン結合ペプチド)、CBD タグ (セルロース結合ドメイン)、CBR タグ (コラーゲン結合ドメイン)、 β -lac/blu (β ラクタマーゼ)、 β -gal (β ガラクトシダーゼ)、luc (ルシフェラーゼ)、HP-Thio (His-patch チオレドキシン)、HSP (熱ショックペプチド)、Ln γ (ラミニン γ ペプチド)、Fn (フィブロネクチン部分ペプチド)、GFP (緑色蛍光ペプチド)、YFP (黄色蛍光ペプチド)、CFP (シアン蛍光ペプチド)、BFP (青色蛍光ペプチド)、DsRed、DsRed2 (赤色蛍光ペプチド)、MBP (マルトース結合ペプチド)、LacZ (ラクトースオペレーター)、IgG (免疫グロブリン G)、アビジン、プロテイン G からなる群から選択されるいずれかのペプチドを指称し、何れの識別ペプチドであっても使用することが可能である。その中でも特にシグナルペプチド、プロテインキナーゼ A、プロテイン A、グルタチオン S 転移酵素、His タグ、myc タグ、FLAG ペプチド、T7 タグ、S タグ、HSV タグ、pelB 又は HA タグが、遺伝子工学的手法による本発明酵素及び本発明ポリペプチドの発現、分泌、単離、精製、分析がより容易となることから好ましい。

本発明発現ベクターを移入すべき宿主細胞としては原核細胞 (例えば大腸菌など) であっても真核細胞 (例えば酵母、昆虫細胞、ほ乳類細胞など) であっても使用することは可能である。特に原核細胞を宿主細胞として使用した場合には、本発明核酸が発現すると糖鎖の付加などがなされないため、糖鎖の付加されていない本発明ポリペプチドを得ることができる。しかし、本発明酵素又は本発明ポリペプチドは真核生物において通常に発現している酵素又はポリペプチドであるため、宿主細胞としては真核細胞が好ましく、好適には昆虫細胞 (本発明酵素又は本発明ポリペプチドの大量合成の面で優れる) 又はほ乳類動

物細胞（本発明酵素本来の発現がなされている細胞である面で優れる）が例示される。

本発明組換え体は、このような宿主細胞に、それに適合した基本ベクターを使用して構築した本発明ベクターを常法により導入した細胞である。

（３）本発明酵素製造方法

本発明酵素製造方法は、本発明組換え体を生育させ、得られた生育物から本発明ポリペプチド又は本発明酵素を採取することを特徴とする本発明ポリペプチド又は本発明酵素の製造方法である。

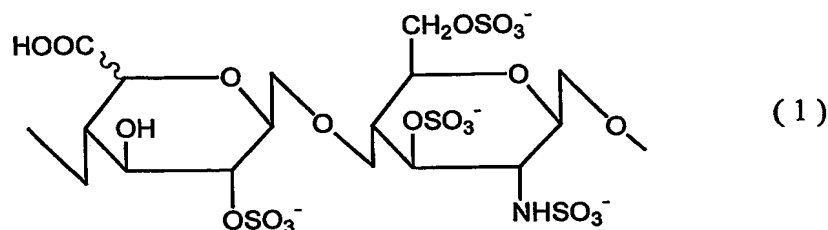
本発明組換え体で生育させる方法は、組換え体に用いた宿主細胞に適した方法を当業者であれば適宜選択して行うことができる。ここで生育とは、組換え体を生体外の例えば培養装置又は培養器具などを用いて培養させることの他に、宿主細胞を生体に投与し、その生体内で増殖させることも含む概念である。

本発明製造方法における生育物とは、細胞を生体外で培養して得られた培地、培養された組換え体そのものの他、生体内で組換え体を育成させた際に得られる生体の排泄物、分泌物、体液、組織なども含まれる。

生育物からの本発明ポリペプチドの採取は、例えばゲル濾過や HPLC などの分子量の相違による分離手段、本発明ポリペプチドの示す酵素反応における硫酸基供与体（PAPS など）を固相化したアフィニティーカラムなどの分離手段の他、本発明ポリペプチドを識別ペプチドとの融合タンパク質として発現した場合においては、識別ペプチドを特異的に吸着する手段により本発明ポリペプチドを分離することが可能である。例えば識別ペプチドとして FLAG ペプチドを用いた場合には、抗 FLAG 抗体を固相化したアフィニティーカラムを用いることで、容易に本発明ポリペプチドを FLAG ペプチドとの融合タンパク質として得ることが可能である。

(4) 本発明酵素剤

本発明酵素剤は「本発明酵素又は本発明ポリペプチドを含むことを特徴とする、下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤」である。



なお、本明細書中において、式 1 中の \sim は糖環に対してカルボキシル基が突出する方向を限定しないことを示す。

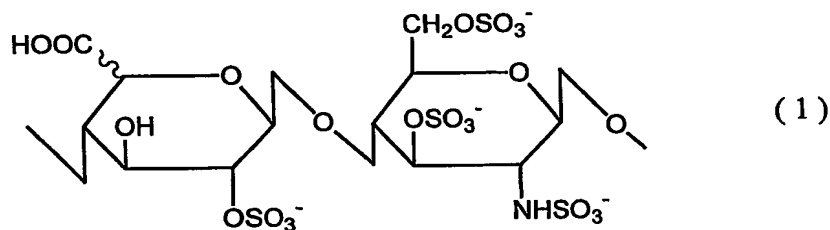
上記本発明酵素剤における「本発明ポリペプチド」及び「本発明酵素」は、それぞれ「ヘパリン及びヘパラン硫酸に対して、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに硫酸基を転移して、上記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンを生成する活性（硫酸基転移酵素活性）を有する酵素のポリペプチド」及び該ポリペプチドを含む酵素であり、本発明酵素剤の活性成分として含まれる。

また、本発明酵素剤による酵素反応における「硫酸基供与体」としては、「硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移することが可能な物質」であれば特に限定はされないが、一般的に生体内で本発明酵素の硫酸基供与体として働いていることが知られている PAPS が好ましい。

なお、「本発明酵素剤」は、活性成分の他に、例えば本発明酵素又は本発明タンパク質を保持する担体（セルロースゲル、アガロースゲル、シリカゲル、ガラスビーズ等）や、それらを安定化したり、製剤化するための安定化剤や賦形剤や、他のポリペプチド（例えば遺伝子工学的に「本発明ポリペプチド」を

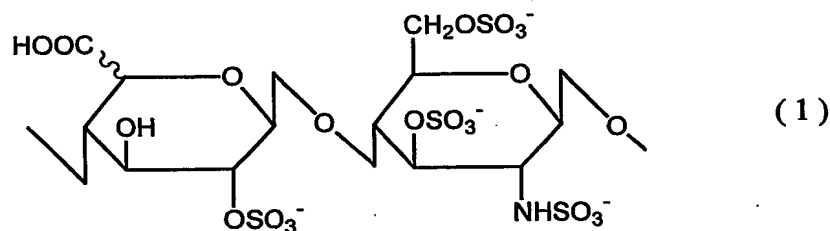
合成する場合に「本発明ポリペプチド」との融合タンパク質を形成するための識別ペプチド等) 或いは糖鎖 (例えば遺伝子工学的に「本発明酵素」又は「本発明ポリペプチド」を合成する場合に宿主として真核生物由来の細胞を用いると、本発明ポリペプチドに糖鎖が付加されることがある) を含んでいても、本発明ポリペプチド又は本発明酵素が有する硫酸基転移酵素活性を妨げない限りにおいて支障はない。

このような本発明酵素剤は、グリコサミノグリカンに、「硫酸基供与体」から硫酸基を転移して下記式 1 記載の構造を含むヘパリン又はヘパラン硫酸の製造方法 (本発明糖鎖製造方法) に使用することができる。

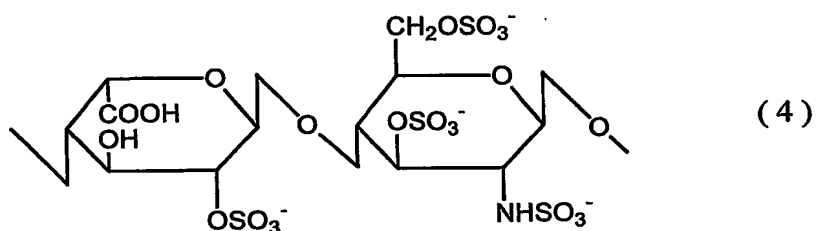
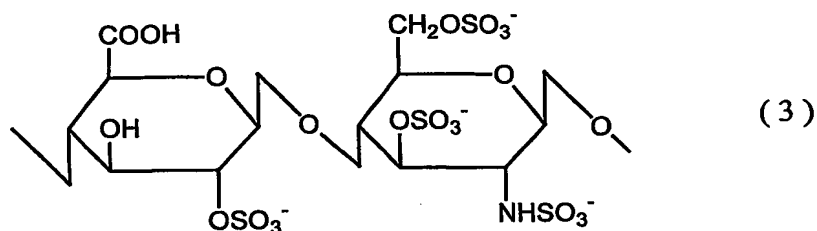


(5) 本発明糖鎖製造法

本発明糖鎖製造方法によって得られるグリコサミノグリカンは、「基本骨格中に下記式 1 で示される二糖を含むことを特徴とするヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカン」である。



また、上記式 1 は、より具体的には下記式 3 及び 4 記載の二糖であり、何れかの二糖が「本発明糖鎖製造方法による生産物」一分子につき 1 以上、好ましくは 3 以上、最も好ましくは 5 以上含まれている。



「本発明糖鎖製造方法による生産物」は、グリコサミノグリカンに前記「本発明酵素剤」を触媒として作用させて調製されるので、その重量平均分子量は原料として使用したヘパリン及びヘパラン硫酸に近い重量平均分子量である。たとえばゲル濾過によって測定した「本発明糖鎖製造方法による生産物」の重量平均分子量は、3000 乃至 30000Da、好ましくは 4000 乃至 27000Da、最も好ましくは 5000 乃至 25000Da である。

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1. 遺伝子データベースの検索と本発明核酸の塩基配列決定

既知のヒト由来のヘパラン硫酸 3-O-スルホトランスフェラーゼ (HS3OST) 遺伝子を用いて、遺伝子データベースから類似遺伝子の検索をおこなった。用い

た配列は HS30ST 遺伝子の配列番号 : AF019386 である。なお、検索は、Blast [Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 402-410 (1990)] を用いた。

その結果、ゲノム配列 GeneBank Accession No. AL355498 の中に類似した配列が見いだされ、HS30ST 遺伝子に相同性を有する新規遺伝子が同定された。遺伝子解析プログラム (GENSCAN: Stanford University 製) によってこの新規遺伝子は2つのエクソンによってコードされていることが予測された。

(1) 本発明ポリペプチドのコード領域の確認

Human Kidney Marathon-Ready cDNA (CLONTECH 社製) を用い、付属の AP1 プライマーと (cDNA 断片の両側に AP1、AP2 のアダプターがついている)、第2エクソンの 5' 末端付近の配列部分に設定したプライマー (GP-226 : 配列番号 6) で PCR (94℃5 秒、68℃4 分を 35 サイクル) をおこなった。さらに Marathon cDNA 付属の AP2 プライマーと配列部分に設定したプライマー (GP-224 : 配列番号 7) で nested PCR (94℃5 秒、68℃4 分を 40 サイクル) をおこなった。その結果得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、約 450b のバンドを Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて回収した。得られた DNA 断片の塩基配列を常法により解析した結果、第1エクソンの配列 (N-末端の 36 アミノ酸がコードされていた) に続き第2エクソンの配列が確認された。これは遺伝子解析プログラムによって予測されたものと同じであった。従って、本発明ポリペプチドのコード領域は第1エクソンと第2エクソンを結合した配列番号 1 に示す配列であることが確認された。

(2) 第2エクソンのクローニング

上記の結果から第1エクソンにコードされているのは N-末端の 36 アミノ酸だけである。第2エクソンが本発明ポリペプチドの大部分をコードしており、活性領域を含む酵素の主要部分は第2エクソン中に含まれていることが予測さ

れた（第2エクソンにコードされた本発明ポリペプチドを便宜的に SFT-1 と記載する）。そこで遺伝子 DNA を鋳型として第2エクソン部分のクローニングをおこなった。

Human Genomic DNA (CLONTECH 社製) を鋳型として第2エクソンを含む領域の PCR (94°C15 秒、50°C30 秒、68°C1 分を 35 サイクル) をおこなった。使用したプライマーは第2エクソンの上流部分 (SFTex2F: 配列番号 8) と停止コドンの下流部分 (SFTex2R: 配列番号 9) のゲノム配列に設定した。得られた約 1kb の断片を常法により精製し、塩基配列を解析した結果、第2エクソンの配列を得られていることが確認された。

実施例 2. SFT-1 遺伝子の発現ベクターへの組込み

遺伝子の発現系を作製するため、まず上記で得られた第2エクソンの DNA をインビトロジェン社製の Gateway システムの発現ベクター pDONR201 に組込み、さらにインビトロジェン社製の Bac-to-Bac システムによる Bacmid を作製した。以下詳細に説明する。

(1) 新規硫酸基転移酵素のエントリークローンの作製

上記で第2エクソンを増幅して得られた PCR 産物を鋳型として、再度 PCR (94°C15 秒、68°C3 分を 30 サイクル) をおこない Gateway システム用の DNA 断片を得た。使用したプライマーは第2エクソンの 5' 末端近くの配列と停止コドン付近の配列に Gateway システム用の配列を付加した 5' プライマー (SFTgateF2: 配列番号 10) および 3' プライマー (SFTgateRstop: 配列番号 11) である。常法により精製した DNA 断片を用い、BP クロナーゼ反応によって pDONR201 へ組み込み、エントリークローンを作製した。反応は目的とする DAN 断片 1 μ l、pDONR201 を 1 μ l (150ng)、反応緩衝液 2 μ l、トリス-エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 緩衝液 (以下「TE」とも略記する) 4 μ l、BP クロナーゼ

ミックス $2\mu\text{l}$ を 25°C で 1 時間インキュベートして行った。プロテイナーゼ K を $1\mu\text{l}$ 加えて 37°C で 10 分保って反応を停止させた。

その後上記反応液 $5\mu\text{l}$ をコンピテントセル（大腸菌 DH5 α ） $100\mu\text{l}$ と混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、カナマイシンを含む LB 培地 3ml で培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）によりプラスミドを抽出精製した。得られたプラスミドの一部を使って常法により塩基配列を測定し、目的とする DNA が組み込まれていることを確認した。

（2）発現クローンの作製

上記エントリークローンは挿入部位の両側に λ フェージが大腸菌から切り出される際の組換部位である attL を持つもので、LR クロナーゼ（ λ フェージの組換酵素 Int、IHF、Xis を混合したもの）とデステイネーションベクターとを混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作製される。具体的工程は以下の通りである。

まずエントリークローン $1\mu\text{l}$ 、pFBIF を $0.5\mu\text{l}$ （75ng）、LR 反応緩衝液 $2\mu\text{l}$ 、TE $4.5\mu\text{l}$ 、LR クロナーゼミックス $2\mu\text{l}$ を 25°C で 1 時間反応させ、プロテイナーゼ K を $1\mu\text{l}$ 加えて 37°C で 10 分間インキュベートして反応を終了させた（この組換反応で pFBIF-SFT-1 が精製される）。pFBIF は pFastBac1 に Ig κ シグナル配列（配列番号 1 2）及び FLAG ペプチド（配列番号 1 3）を挿入したもので、OT3（配列番号 1 4）を鋳型とし、プライマー OT20（配列番号 1 5）と OT21（配列番号 1 6）によって得られた DNA 断片を上記と同様に BamHI と EcoRI 部位に挿入し、Gateway 配列を挿入するため、Gateway Vector Conversion System（インビトロジェン社製）を用いて Conversion cassette を挿入した。Ig κ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAG タグは生成を容易とするために挿入した。

その後上記反応液 $5\mu\text{l}$ をコンピテントセル（大腸菌 DH5 α ） $50\mu\text{l}$ と混合し、ヒートショック法による形質転換の後、アンピシリンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、アンピシリンを含む LB 培地 5ml で培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit（キアゲン社製）によりプラスミド（pFBIF-SFT-1）を抽出精製した。得られたプラスミドの一部を使って常法により塩基配列を測定し、目的とする DNA が組み込まれていることを確認した。

（3）Bac-to-Bac システムによる Bacmid の作製

続いて Bac-to-Bac システム（インビトロジェン社製）を用いて上記 pFBIF-SFT-1 と pFastBac との間で組換を行い、昆虫細胞中で増殖可能な Bacmid に SFT-1 の配列を挿入した。このシステムは Tn7 の組換部位を利用して、Bacmid を含む大腸菌（E. coli DH10BAC）に目的遺伝子を挿入させた pFastBac を導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生される組換タンパク質によって目的とする遺伝子が Bacmid へ取り込まれるシステムである。また Bacmid には lacZ 遺伝子が含まれており、古典的なコロニーの色（青（挿入なし）－白（挿入あり））による選択が可能である。

すなわち、上記精製ベクター（pFBIF-SFT-1）をコンピテントセル（大腸菌 DH10BAC） $50\mu\text{l}$ と混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、5-プロモインドリル β -D-ガラクトピラノシド（Blue-gal）、及びイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を含む LB プレートにまき翌日白い単独コロニーをさらに培養し、Bacmid を回収した。

実施例 3. Bacmid の昆虫細胞への導入と SFT-1 の回収

上記白いコロニーから得られた Bacmid を昆虫細胞 Sf21（インビトロジェン社製）に導入した。すなわち 35mm のシャーレに Sf21 細胞が 9×10^5 個/2ml の

抗生物質を含む Sf-900IISFM (インビトロジェン社製) となるように添加し、27°Cで 1 時間培養して細胞を接着させた。溶液 A として精製した Bacmid DNA 5 μ l に抗生物質を含まない Sf-900IISFM を 100 μ l 加えた。溶液 B として CellFECTIN 溶液 (インビトロジェン社製) 6 μ l に抗生物質を含まない Sf-900IISFM 100 μ l を加えた。その後、溶液 A 及び溶液 B を丁寧に混合して 15～45 分間、室温でインキュベートした。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して抗生物質を含まない Sf-900IISFM を 2ml 添加した。溶液 A と溶液 B とを混合して作製した溶液 (lipid-DNA complexes) に抗生物質を含まない Sf900IISFM 800 μ l を加えて丁寧に混和した。細胞から培養液を吸引し、希釈した lipid-DNA complexes 溶液を細胞に加え、27°Cで 5 時間インキュベーションした。その後、トランスフェクション混合物を除き、抗生物質を含む Sf-900IISFM 培養液 2ml を加えて 72 時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 1,200 \times g で 10 分間遠心処理し、上清を別のチューブに保存した (これを一次ウイルス液とした)。

T75 培養フラスコに Sf21 細胞 6×10^6 個/15ml Sf-900IISFM (インビトロジェン社製) (抗生物質を含む) を入れ、一次ウイルス液を 1ml 添加し、27°Cで 96 時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 1,200 \times g で 10 分間遠心処理し、上清をチューブに保存した (これを二次ウイルス液とした)。

さらに、T75 培養フラスコに Sf21 細胞 6×10^6 個/15ml Sf-900IISFM (インビトロジェン社製) (抗生物質を含む) を入れ、二次ウイルス液を 1ml 添加し、27°Cで 72 時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 1,200 \times g で 10 分間遠心処理し、上清をチューブに保存した (これを三次ウイルス液とした)。

加えて、100ml 用スピナーフラスコに Sf21 細胞 6×10^5 個/ml 濃度で 100ml を入れ、三次ウイルス液を 1ml 添加して 27°Cで約 96 時間培養した。培養後に、

細胞及び培養液を回収した。これを $1,200\times g$ で 10 分間遠心処理し、上清を回収した。

この培養上清 10ml にアジ化ナトリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カルシウムを加え、終濃度をアジ化ナトリウムを 0.05%、塩化ナトリウムを 150mmol/l、塩化カルシウムを 2mmol/l とした。抗 FLAG 抗体ゲル (Anti-Flag M1 monoclonal antibody Agarose Affinity Gel, SIGMA 社製) $50\mu l$ を加えて 12 時間静かに攪拌した。遠心分離 ($1,000\times g$ 、3 分、 $4^{\circ}C$) して上清を除去した後、1mmol/l の塩化カルシウムを含むトリス緩衝生理的食塩水 (TBS) で 3 回洗浄した。これを遠心分離 ($1,000\times g$ 、3 分、 $4^{\circ}C$) して余分な洗浄液を除き SFT-1-FLAG 融合タンパク質を得、活性測定用の本発明酵素剤とした。

実施例 4. SFT-1-FLAG の確認と酵素活性の測定

(1) SFT-1 の確認

上記で精製した融合タンパク質 (SFT-1-FLAG) を結合したゲル $5\mu l$ を使い、ペルオキシダーゼ標識抗 FLAG 抗体 (Anti-FLAG M2 Peroxydase, SIGMA 社製) を用いて常法に従ってウエスタンブロッティングをおこなった (第 1 図)。その結果、培養上清中に発現している FLAG タンパク質と新規硫酸基転移酵素との融合タンパク質が回収精製されていることが確認された。

(2) 本発明酵素剤のヘパラン硫酸およびヘパリンへの硫酸転移活性測定

$75\mu g/ml$ のプロタミン塩酸を含む 50mmol/l のイミダゾール塩酸緩衝液 (pH6.8) に、培養上清から精製した融合タンパク質 (SFT-1-FLAG) を添加し、硫酸供与体として $[^{35}S]$ -PAPS (5×10^5 cpm, NEN 社製)、硫酸受容体としてヘパラン硫酸 (ウシ腎臓由来: 生化学工業株式会社製) 及びヘパリン (ブタ腸由来: SIGMA 社製) (ヘキソサミン量に換算して $500\mu mol/l$) を添加して、全量を $50\mu l$ となるように蒸留水で調整した。この反応液を $37^{\circ}C$ で 20 分反応させ、

その後、100℃で 3 分加熱して酵素を失活させて反応を停止した。1.3%酢酸カリウムと 0.5mmol/l EDTA を含むエタノールを 130 μ l 加えて攪拌した後、遠心分離して得られた沈殿を蒸留水 50 μ l に溶解した。再度エタノール沈殿を行い、水 50 μ l に溶解した後、ポアサイズ 0.22 μ m のマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、HPLC で分離した。カラムは G2500PW（東ソー株式会社製）を使用し、移動相は 0.2mol/l の塩化ナトリウム、流速 0.6ml/分、カラム温度 35℃で分離を行った。カラムからの溶出液を 0.3ml 毎の画分として回収し、各画分の放射能をシンチレーションカウンターにより計数した（第 2 図）。その結果、溶出時間約 12 分の位置に放射能のピークが検出された。この溶出時間は硫酸受容体であるヘパラン硫酸またはヘパリンの溶出時間と一致することから、これら 2 種類の受容体に対して硫酸基を転移する活性を示すことが確認された。

また、コンドロイチン硫酸 D（サメ軟骨由来：生化学工業株式会社製）、コンドロイチン（牛気管由来コンドロイチン硫酸を J. Am. Chem. Soc., 79, 152-153 (1957) 記載の方法に従って完全脱硫酸化して調製した）、デルマトン硫酸（ブタ皮由来：生化学工業株式会社製）、及び脱硫酸化デルマトン硫酸（ニワトリ鶏冠由来デルマトン硫酸を J. Am. Chem. Soc., 79, 152-153 (1957) 記載の方法に従って完全脱硫酸化して調製した）を硫酸受容体とし、上記活性測定法と同じ条件で硫酸転移活性を測定した結果、これら受容体に対して硫酸基転移酵素活性は観察されなかった（第 3 図）。したがって SFT-1 はヘパラン硫酸およびヘパリンに対して特異的活性を持つことが示唆された。

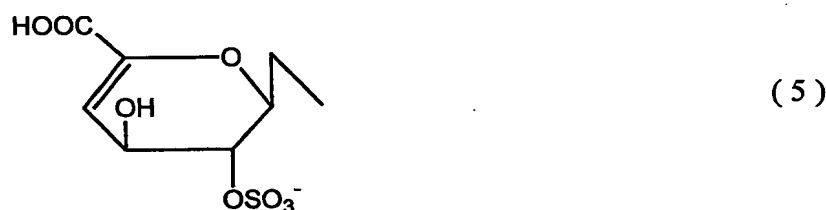
実施例 5. 本発明酵素剤によるヘパリンの修飾

本発明酵素剤を用いてヘパリンの硫酸化反応を行なった。反応溶液は 50mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH6.8) 150 μ l 中に、プロタミン塩酸 11 μ g、ヘパリン（シグマ社製）0.3mg、 $[^{35}\text{S}]$ -PAPS (2.3×10^7 dpm : パーキンエルマー社

製) および本発明酵素剤 1 (20 μ l) を含む。37°C で 3 時間インキュベートした後、70%エタノール沈殿を 2 回行なってヘパリンを回収した。室温に放置してエタノールを蒸発させ、ヘパリン分解酵素反応用緩衝液 30 μ l (20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0 : 2mM 酢酸カルシウムを含む)) に溶解した後、ヘパリン分解酵素 (ヘパリナーゼ 150mU (生化学工業株式会社製)、ヘパリチナーゼ I 90mU (生化学工業株式会社製) 及びヘパリチナーゼ II 60mU (生化学工業株式会社製) : これらの酵素はヘパリン骨格中の GlcN とウロン酸 (HexA) との β 1,4 グリコシド結合部分 (GlcN β 1,4HexA) を加水分解して、不飽和ウロン酸 (Δ HexA) と GlcN が 1,4 グリコシド結合した不飽和二糖 (Δ HexA1,4GlcN) を生ずる) を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、100°C で 1 分間加熱して反応を停止し、ポアサイズ 0.22 μ m のフィルター (ミリポア社製) でろ過した後、HPLC で分離した。使用したカラムは CarboPac PA1 (4 \times 250mm : ダイオネクス社製)、CarboPac PA1 ガードカラム (ダイオネクス社製)、流速 0.8ml/min、カラム温度 40°C の条件下で、0-5-8-15-20-28-40 分の溶出時間に対して 1-6-19-38-70-76-76% の 3mol/l リチウム塩酸で濃度勾配により溶出した。溶出液を 0.2ml ずつ分取し、そのうち 10 μ l をシンチレーションカウンターで分析して放射能の溶出位置を確認した (第 4 図)。その結果、保持時間 30 分に強い放射能を有するピークが現れた。

そこで保持時間 30 分に現れたピークを回収し、セルロファイン G25sf カラム (1 \times 24cm : 生化学工業株式会社販売) で脱塩した。脱塩した試料を凍結乾燥器で 0.1ml に濃縮して「濃縮試料」とした。「濃縮試料」の 2 μ l を Δ 4,5-グルクロン酸-2-スルファターゼ (不飽和ウロン酸残基の 2 位硫酸エステルを特異的に加水分解して脱硫酸化する酵素 : Eur. J. Biochem, 145, 607-615 (1984) の方法に従って精製した) で消化した。反応溶液は 20mmol/l 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5 : 0.15% ウシ血清アルブミン、ヘパリン二脱硫酸化酵素 4.1mU を含む) 5ml を使用した。37°C で 2 時間反応させた後、100°C で 1 分間加

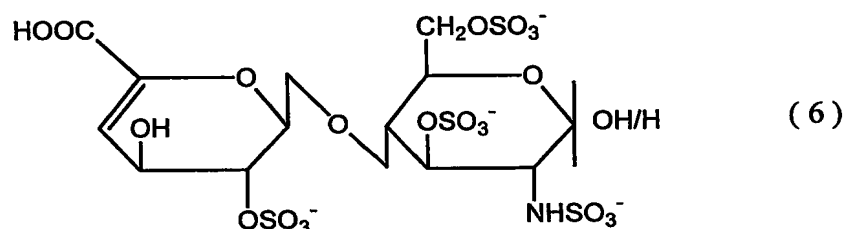
熱して反応を停止した。蒸留水 $18\mu\text{l}$ を加えてポアサイズ $0.22\mu\text{m}$ のフィルター（ミリポア社製）でろ過し、上記と同じ条件で HPLC で分離した（第 5 図）。その結果、ヘパリン二脱硫酸化酵素で消化していない対照では、保持時間約 30.5 分にピークが認められた（第 5 A 図）が、 $\Delta 4, 5$ -グルクロン酸-2-スルファターゼで処理した濃縮試料で、ピークの保持時間が約 22 分に移動していた（第 5 B 図）。すなわち、不飽和ウロン酸の 2 位硫酸基を特異的に脱硫酸化する酵素で処理してピークの移動が観察されたことから、濃縮試料に含まれる不飽和二糖には下記式 5 の $\Delta\text{HexA}(2\text{S})$ 構造が含まれることが確認された。



次に、上記「濃縮試料」のうち $2\mu\text{l}$ を 70mM 酢酸水銀 (pH5.0) $2\mu\text{l}$ と混合して室温で 10 分間放置することにより不飽和ウロン酸を除去し（この反応により不飽和二糖中の不飽和ウロン酸のみが特異的に分解される：Biochem. J., 245, 795-804 (1987)）、1mol/l 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0) $2\mu\text{l}$ 及び 0.5mol/l テトラヒドロほう酸ナトリウム (0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液) $2\mu\text{l}$ を加え、 50°C で 30 分インキュベートして還元反応を行なった後、上記と同じ条件で HPLC で分離を行なった（第 6 図）。不飽和ウロン酸を分解した後の「濃縮試料」の溶出パターン（第 6 A 図）と、 $[^3\text{H}]$ テトラヒドロほう酸ナトリウムによる還元反応でラベルした標準品 (GlcN(NS, 3S) : 14 分近辺のピーク 1、GlcN(NS, 3S, 6S) : 22~23 分近辺のピーク 2) の溶出パターン（第 6 B 図）とを対比すると、試料の保持時間は GlcN(NS, 3S, 6S) のもの（ピーク 2）と一致していた。このことから、不飽和ウロン酸を分解した後の「濃縮試料」は 2 位アミ

ノ基、3 位ヒドロキシル基、及び 6 位ヒドロキシル基が硫酸化されている GlcN であることが明かとなった。

第 5 図及び第 6 図の結果から、濃縮試料に含まれていた不飽和二糖は下記式 6 に示す不飽和二糖 (Δ HexA(2S)-GlcN(NS, 3S, 6S)) であったことが確認され、ヘパリン分解酵素で分解をする前のグリコサミノグリカンには、上記式 1 で示される構造が含まれていたことが示された。



上記と同様の硫酸化反応条件によって本発明酵素剤でヘパラン硫酸（シグマ社製）を硫酸化し、上記同様にヘパリン分解酵素で消化した試料を HPLC で分離したところ、ヘパリンに比べて生成量は少ないが、保持時間約 30.5 分にピークが検出された（第 7 図矢印で示したピーク）。これはヘパリンで確認された Δ HexA(2S)-GlcN(NS, 3S, 6S) と同じ保持時間であることから、ヘパラン硫酸を硫酸基受容体にした場合にも上記式 1 で示される構造を含むグリコサミノグリカンが生成していたことが明かとなった。

産業上の利用可能性

本発明により、ヘパラン硫酸に硫酸基を選択的に転移する新規なヘパラン硫酸硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有する核酸が得られる。また更に該核酸から発現されるポリペプチドが得られる。

さらに、本発明により、新規なヘパラン硫酸硫酸基転移酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有する核酸が得られたので、該酵素を工業的に使用可

能な程度まで大量生産できることが期待される。また、該酵素の有する酵素活性により、新たな構造を有するグリコサミノグリカンが提供される。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 2 記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号 37～346 を有するポリペプチド、または該アミノ酸配列に 1 又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加および／または転移を有するアミノ酸配列を有するとともに硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素のポリペプチド。
2. ポリペプチドが配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求の範囲 1 記載のポリペプチド。
3. ポリペプチドが配列番号 2 記載のアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 37～346 からなることを特徴とする請求の範囲 1 記載のポリペプチド。
4. グリコサミノグリカンがヘパリン又はヘパラン硫酸であることを特徴とする請求の範囲 1～3 のいずれか一項記載のポリペプチド。
5. 請求の範囲 1～4 のいずれか一項記載のポリペプチドを含むとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素。
6. 請求の範囲 1～4 のいずれか一項記載のポリペプチド又は請求の範囲 5 記載の硫酸基転移酵素をコードする核酸。
7. 配列番号 1 記載の塩基配列からなることを特徴とする核酸。

8. 請求の範囲 6 又は 7 記載の核酸又はその塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることを特徴とする核酸。

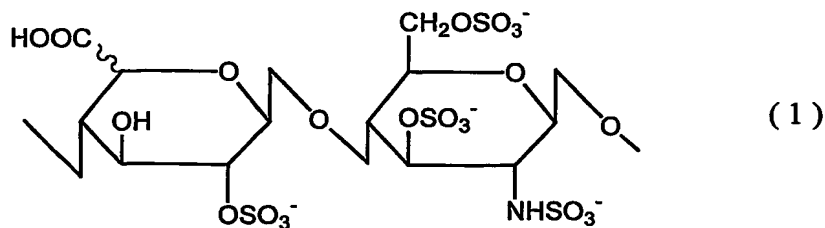
9. 請求の範囲 6 ～ 8 のいずれか一項記載の核酸を含むことを特徴とする発現ベクター。

10. 請求の範囲 9 記載の発現ベクターを含むことを特徴とする組換え体。

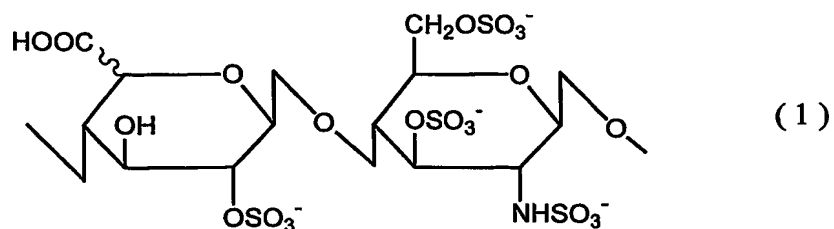
11. 宿主細胞に請求の範囲 9 記載の発現ベクターを導入してなることを特徴とする組換え体。

12. 請求の範囲 10 又は 11 記載の組換え体を生育させ、得られた生育物から請求の範囲 1 ～ 4 のいずれか一項記載のポリペプチド又は請求の範囲 5 記載の硫酸基転移酵素を採取することを特徴とするポリペプチド又は硫酸基転移酵素の製造方法。

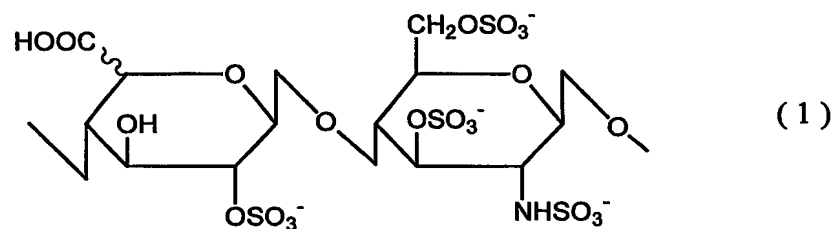
13. 請求の範囲 1 ～ 4 のいずれか一項記載のポリペプチド又は請求の範囲 5 記載の硫酸基転移酵素を含むことを特徴とする、下記式 1 記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成のための酵素剤。



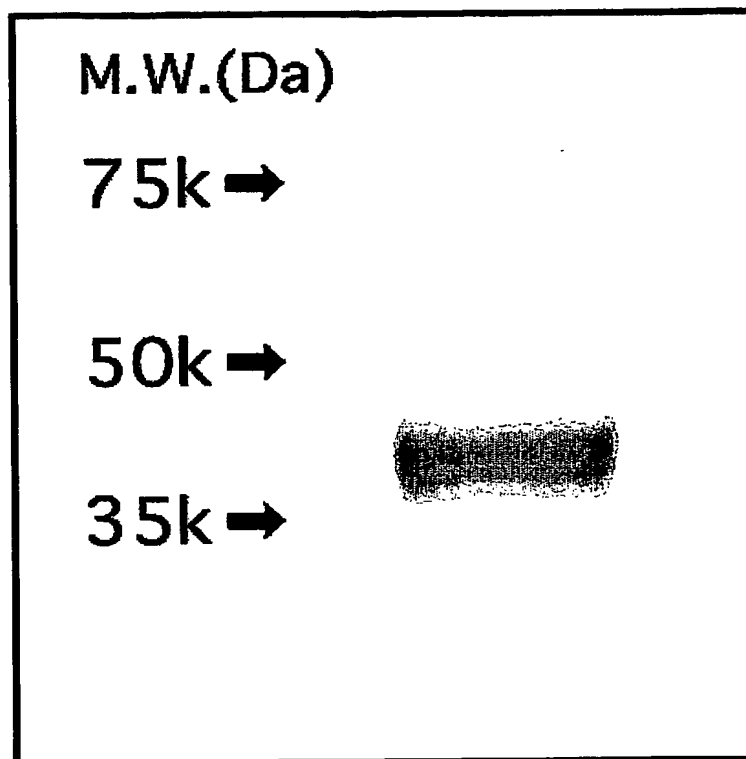
14. ヘパリン又はヘパラン硫酸に、請求の範囲13記載の酵素剤を作用させて、硫酸基供与体から硫酸基受容体に硫酸基を転移することを特徴とする下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの製造方法。



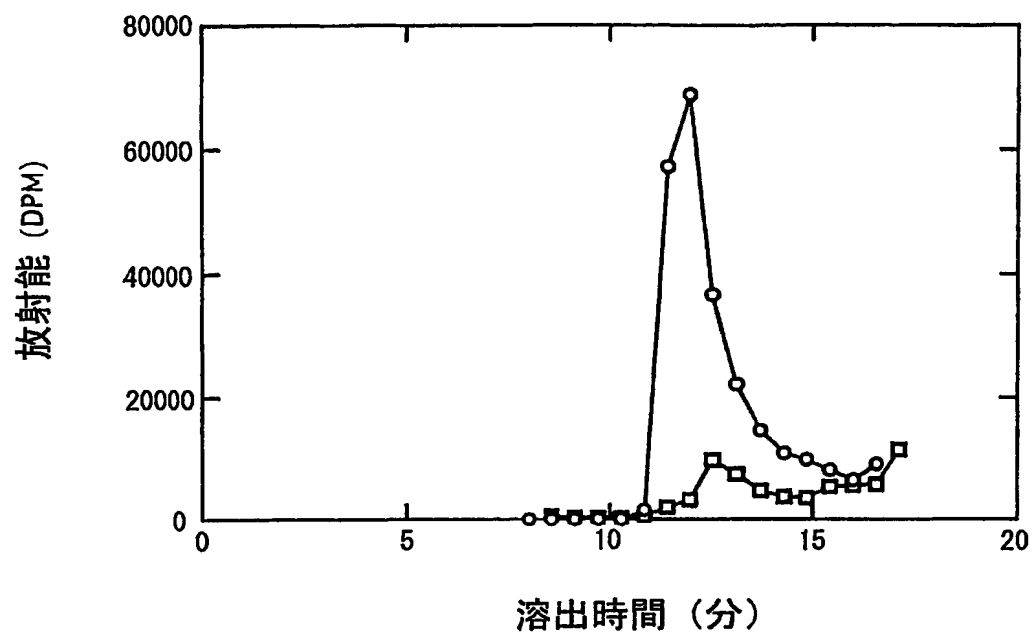
15. 請求の範囲1～4のいずれか一項記載のポリペプチド又は請求の範囲5記載の硫酸基転移酵素の、下記式1記載の構造を含むグリコサミノグリカンの合成の触媒としての使用。



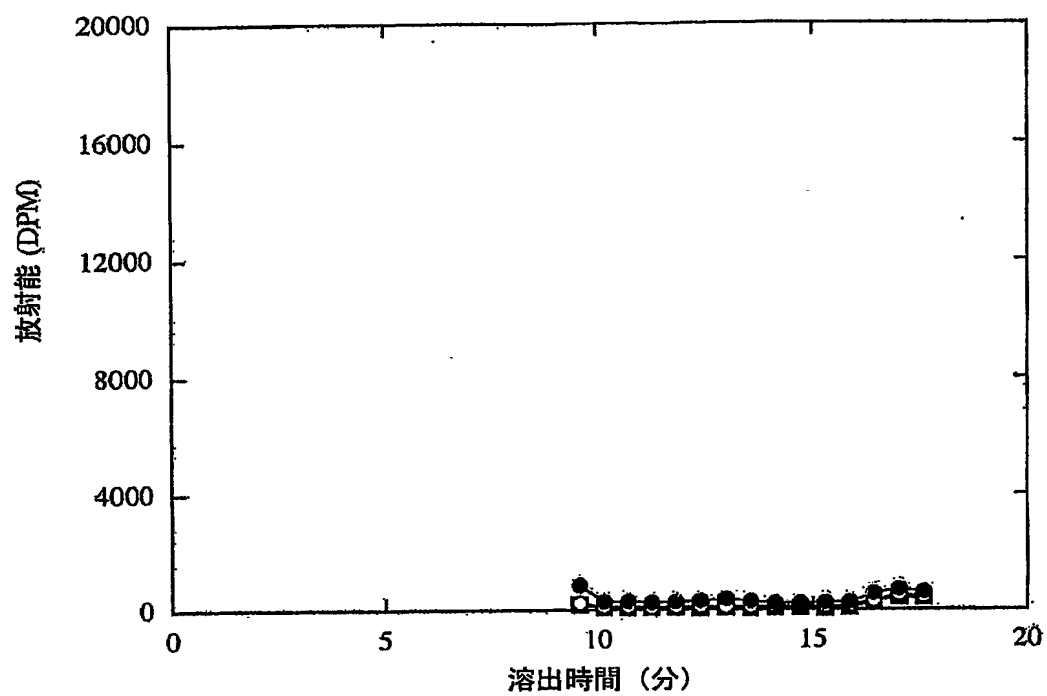
第 1 図



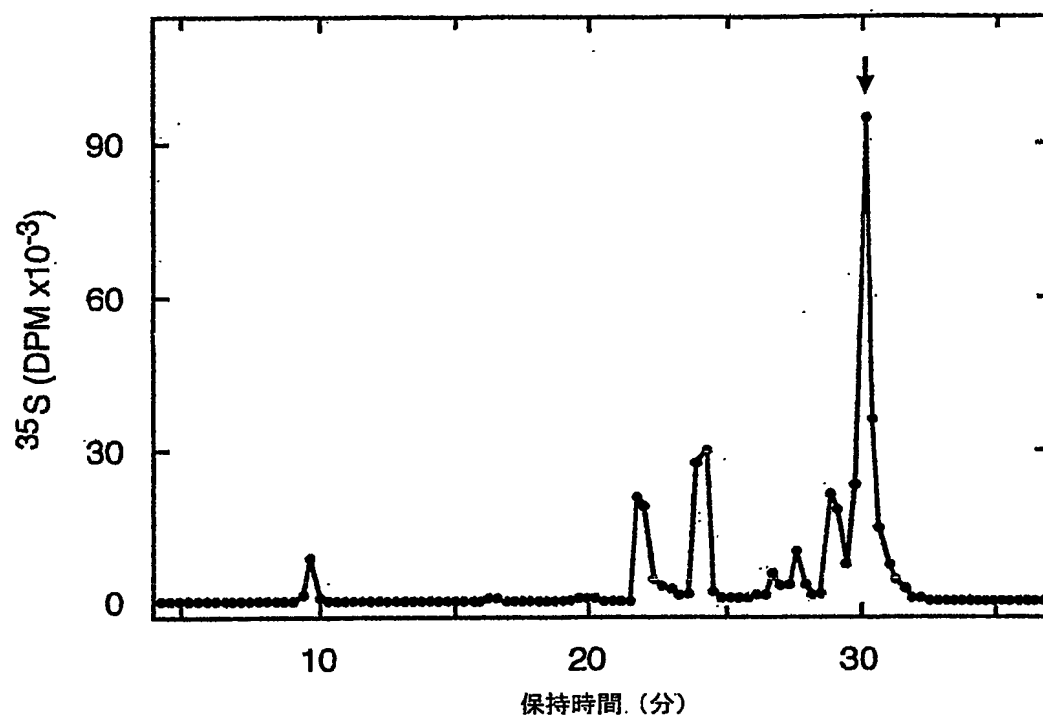
第 2 図



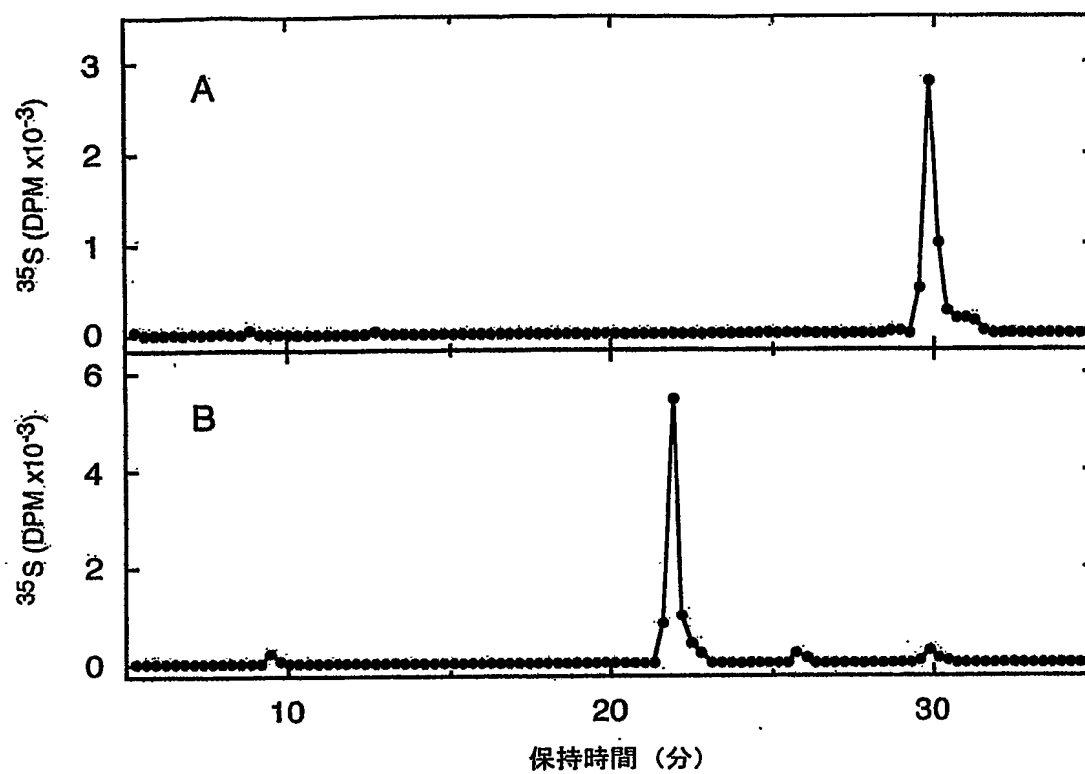
第3図



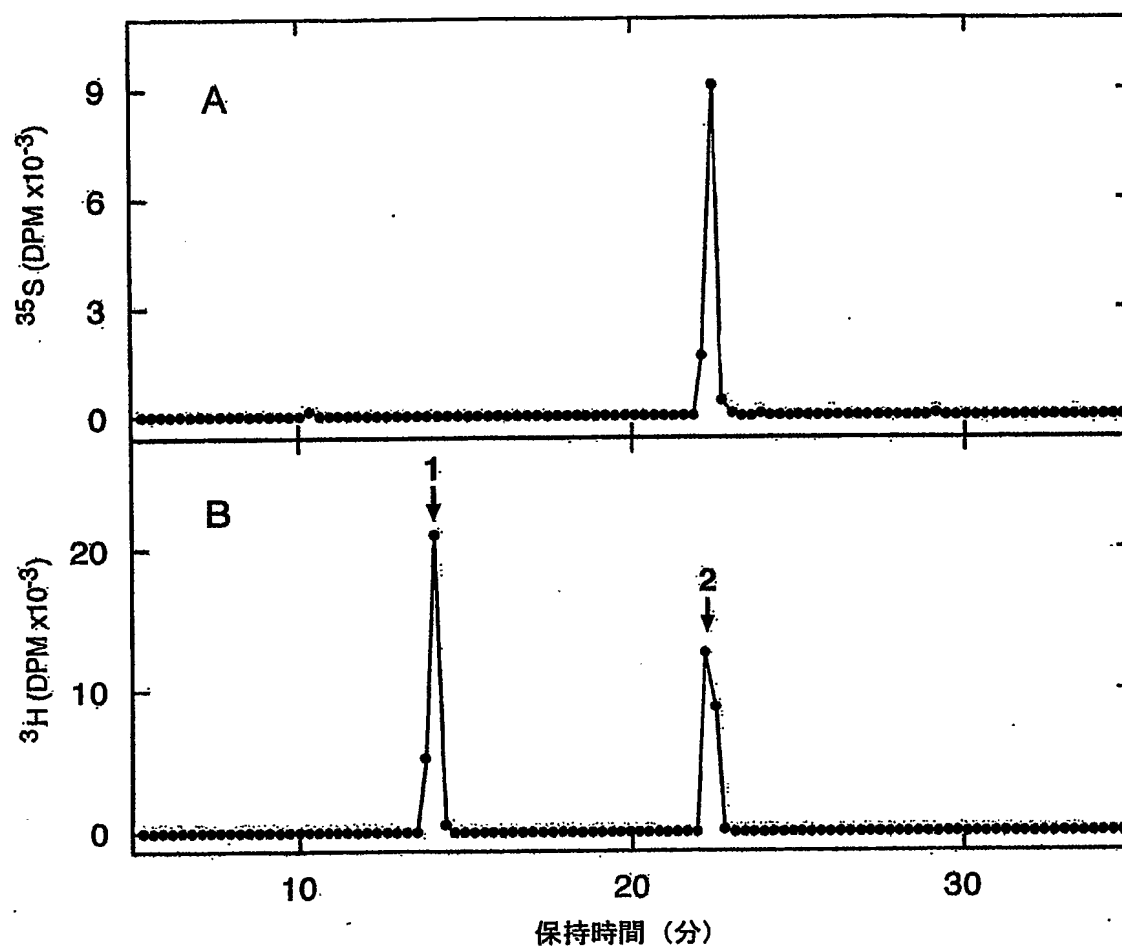
第4図



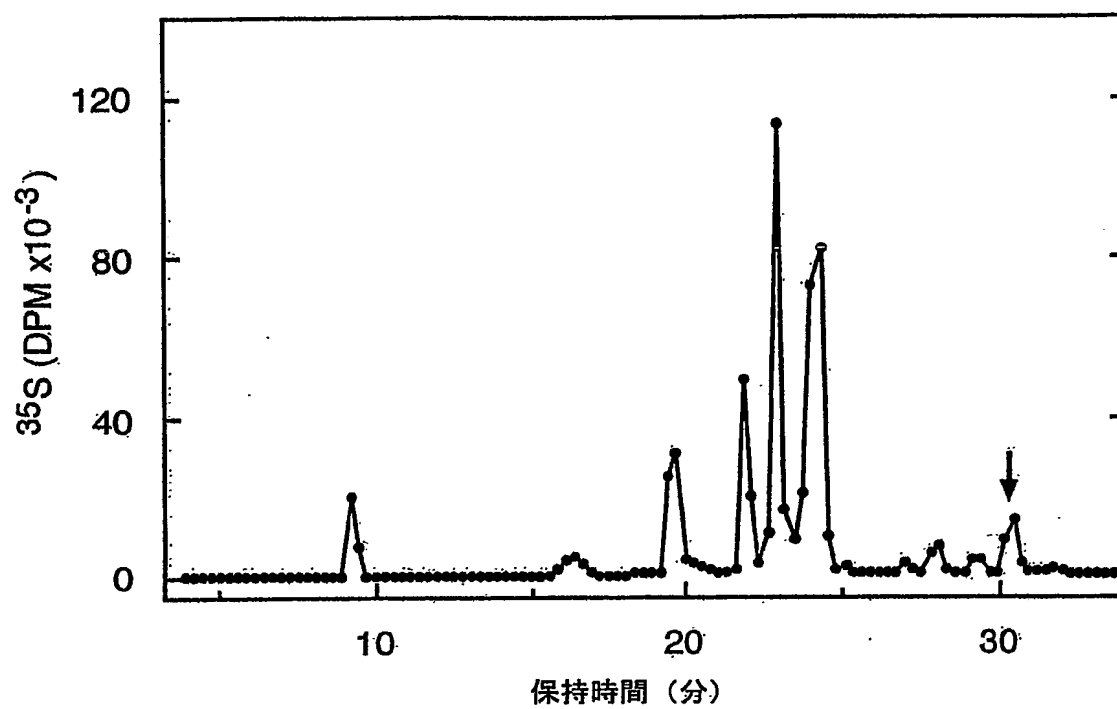
第 5 図



第6図



第 7 図



SEQUENCE LISTING

<110> SEIKAGAKU CORPORATION

<110> AMERSHAM BIOSCIENCES K. K.

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Novel heparan sulfate sulfotransferase and nucleic acid encoding the same

<130> P044187

<150> JP 2002-57527

<151> 2002-03-04

<150> JP 2002-245994

<151> 2002-08-26

<160> 16

<210> 1

<211> 1041

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1041)

<400> 1

atg cta ttc aaa cag cag gcg tgg ctg aga cag aag ctc ctg gtg ctg 48
 Met Leu Phe Lys Gln Gln Ala Trp Leu Arg Gln Lys Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

gga agc ctt gcc gtt ggg agt ctc ctg tat cta gtc gcc aga gtt ggg 96
 Gly Ser Leu Ala Val Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ala Arg Val Gly

20 25 30

agc ttg gat agg cta caa ccc att tgc ccc att gaa ggt cga ctg ggt 144
 Ser Leu Asp Arg Leu Gln Pro Ile Cys Pro Ile Glu Gly Arg Leu Gly

35 40 45

gga gcc cgc act cag gct gaa ttc cca ctt cgc gcc ctg cag ttt aag 192
 Gly Ala Arg Thr Gln Ala Glu Phe Pro Leu Arg Ala Leu Gln Phe Lys

50	55	60	
cgt ggc ctg ctg cac gag ttc cgg aag ggc aac gct tcc aag gag cag			240
Arg Gly Leu Leu His Glu Phe Arg Lys Gly Asn Ala Ser Lys Glu Gln			
65	70	75	80
ggt cgc ctc cat gac ctg gtc cag cag ctc ccc aag gcc att atc att			288
Val Arg Leu His Asp Leu Val Gln Gln Leu Pro Lys Ala Ile Ile Ile			
	85	90	95
ggg gtg agg aaa gga ggc aca agg gcc ctg ctt gaa atg ctg aac cta			336
Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Asn Leu			
	100	105	110
cat ccg gca gta gtc aaa gcc tct caa gaa atc cac ttt ttt gat aat			384
His Pro Ala Val Val Lys Ala Ser Gln Glu Ile His Phe Phe Asp Asn			
	115	120	125
gat gag aat tat ggt aag ggc att gag tgg tat agg aaa aag atg cct			432
Asp Glu Asn Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Lys Met Pro			
	130	135	140
ttt tcc tac cct cag caa atc aca att gaa aag agc cca gca tat ttt			480
Phe Ser Tyr Pro Gln Gln Ile Thr Ile Glu Lys Ser Pro Ala Tyr Phe			
	145	150	155
atc aca gag gag gtt cca gaa agg att tac aaa atg aac tca tcc atc			528
Ile Thr Glu Glu Val Pro Glu Arg Ile Tyr Lys Met Asn Ser Ser Ile			
	165	170	175
aag ttg ttg atc att gtc agg gag cca acc aca aga gct att tct gat			576
Lys Leu Leu Ile Ile Val Arg Glu Pro Thr Thr Arg Ala Ile Ser Asp			
	180	185	190
tat act cag gtg cta gag ggg aag gag agg aag aac aaa act tat tac			624
Tyr Thr Gln Val Leu Glu Gly Lys Glu Arg Lys Asn Lys Thr Tyr Tyr			
	195	200	205
aag ttt gag aag ctg gcc ata gac cct aat aca tgc gaa gtg aac aca			672
Lys Phe Glu Lys Leu Ala Ile Asp Pro Asn Thr Cys Glu Val Asn Thr			
	210	215	220
aaa tac aaa gca gta aga acc agc atc tac acc aaa cat ctg gaa agg			720
Lys Tyr Lys Ala Val Arg Thr Ser Ile Tyr Thr Lys His Leu Glu Arg			
	225	230	235
			240

tgg ttg aaa tac ttt cca att gag caa ttt cat gtc gtc gat gga gat 768
 Trp Leu Lys Tyr Phe Pro Ile Glu Gln Phe His Val Val Asp Gly Asp
 245 250 255

cgc ctc atc acg gaa cct ctg cca gaa ctt cag ctc gtg gag aag ttc 816
 Arg Leu Ile Thr Glu Pro Leu Pro Glu Leu Gln Leu Val Glu Lys Phe
 260 265 270

cta aat ctg cct cca agg ata agt caa tac aat tta tac ttc aat gct 864
 Leu Asn Leu Pro Pro Arg Ile Ser Gln Tyr Asn Leu Tyr Phe Asn Ala
 275 280 285

acc aga ggg ttt tac tgc ttg cgg ttt aat att atc ttt aat aag tgc 912
 Thr Arg Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Phe Asn Ile Ile Phe Asn Lys Cys
 290 295 300

ctg gcg ggc agc aag ggg cgc att cat cca gag gtg gac ccc tct gtc 960
 Leu Ala Gly Ser Lys Gly Arg Ile His Pro Glu Val Asp Pro Ser Val
 305 310 315 320

att act aaa ttg cgc aaa ttc ttt cat cct ttt aat caa aaa ttt tac 1008
 Ile Thr Lys Leu Arg Lys Phe Phe His Pro Phe Asn Gln Lys Phe Tyr
 325 330 335

cag atc act ggg agg aca ttg aac tgg ccc taa 1041
 Gln Ile Thr Gly Arg Thr Leu Asn Trp Pro
 340 345

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Phe Lys Gln Gln Ala Trp Leu Arg Gln Lys Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Ala Val Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ala Arg Val Gly
 20 25 30

Ser Leu Asp Arg Leu Gln Pro Ile Cys Pro Ile Glu Gly Arg Leu Gly
 35 40 45

Gly Ala Arg Thr Gln Ala Glu Phe Pro Leu Arg Ala Leu Gln Phe Lys
 50 55 60

Arg Gly Leu Leu His Glu Phe Arg Lys Gly Asn Ala Ser Lys Glu Gln
 65 70 75 80

Val Arg Leu His Asp Leu Val Gln Gln Leu Pro Lys Ala Ile Ile Ile

<210> 4
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' Primer for PCR

<400> 4
ttagggccag tt 12

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' Primer for PCR

<400> 5
atgctattca aa 12

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' Primer for PCR (GP-226)

<400> 6
cggaactcgt gcagcaggcc acgc 24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (GP-224)

<400> 7

tcgaccttca atggggcaaa tggg

24

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (SFTex2F)

<400> 8
actggggaac cagaaaaatg aaaag

25

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (SFTex2R)

<400> 9
gtgtctccag gcacaacaca tagtg

25

<210> 10
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (SFTgateF2)

<400> 10
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cttaagcgt ggcctgctgc acgag

55

<210> 11
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (SFTgateTstop)

<400> 11

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tagggccagt tcaatgtcct ccc 53

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Ig kappa signal sequence

<400> 12

Met	His	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1				5				10					15		

Val	Ile	Met	Ser	Arg	Gly
				20	

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FLAG peptide

<400> 13

Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Lys
1				5		

<210> 14

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT3 seugnce

<400> 14

gatcatgcat	tttcaagtgc	agattttcag	cttcctgcta	atcagtcct	cagtcataat	60
gtcacgtgga	gattacaagg	acgacgatga	caag			94

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT20 sequence

<400> 15

cgggatccat gcattttcaa gtgcag

26

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT21 sequence

<400> 16

ggaattcttg tcatcgctcgt ccttg

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02/42437 A2 (PE CORP. NY), 30 May, 2002 (30.05.02), & US 2002/0086381 A1 & US 6420150 B1 & AU 200239256 A	1-15
P, X	Xia G. et al., Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1., J.Biol.Chem. (2002 Oct.), Vol.277, No.40, pages 37912 to 37919	1-15
X	WO 01/90334 A2 (INCYTE GENOMICS INC.), 29 November, 2001 (29.11.01), & AU 200174981 A	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 April, 2003 (02.04.03)Date of mailing of the international search report
15 April, 2003 (15.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02500

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1311305 A (BODE GENE DEV. CO., LTD. SHANGHAI), 05 September, 2001 (05.09.01), (Family: none)	1-15
X	Shworak NW. et al., Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D- glucosaminyl 3-O-sulfotransferase., J.Biol.Chem. (1997), Vol.272, No.44, pages 28008 to 28019	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),
 Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG),
 JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO 02/42437 A2 (PE CORP NY) 2002.05.30 & US 2002/0086381 A1 & US 6420150 B1 & AU 200239256 A	1-15
P X	Xia G, et. al., Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1., J Biol Chem. (2002 Oct), Vol. 277, No. 40, p. 37912-37919	1-15
X	WO 01/90334 A2 (INCYTE GENOMICS INC) 2001.11.29 & AU 200174981 A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.04.03

国際調査報告の発送日

15.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	CN 1311305 A (BODE GENE DEV CO LTD SHANGHAI) 2001. 09. 05 (ファミリーなし)	1 - 15
X	Shworak NW, et. al., Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase., J Biol Chem. (1997), Vol. 272, No. 44, p. 28008-28019	1 - 15